

PATENT
8961-000009/US

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicants: HUI-JEN TSAI
Application No.: NEW
Filed: January 20, 2004
For: RECOMBINANT PLASMID EXPRESSING TWO FLUORESCENCE
GENES

PRIORITY LETTER

January 20, 2004

COMMISSIONER FOR PATENTS
P.O. BOX 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

Dear Sirs:

Pursuant to the provisions of 35 U.S.C. 119, enclosed is/are a certified copy of the following priority document(s).

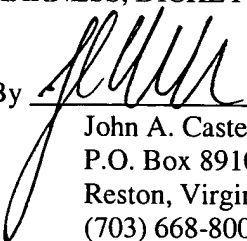
<u>Application No.</u>	<u>Date Filed</u>	<u>Country</u>
092109420	April 23, 2003	REPUBLIC OF CHINA

In support of Applicant's priority claim, please enter this document into the file.

Respectfully submitted,

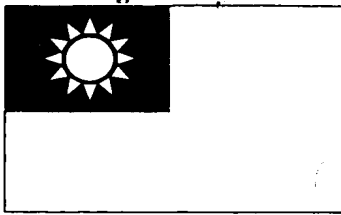
HARNESS, DICKEY, & PIERCE, P.L.C.

By



John A. Castellano, Reg. No. 35,094
P.O. Box 8910
Reston, Virginia 20195
(703) 668-8000

JAC/jj



中華民國經濟部智慧財產局

INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE
MINISTRY OF ECONOMIC AFFAIRS
REPUBLIC OF CHINA

茲證明所附文件，係本局存檔中原申請案的副本，正確無訛，
其申請資料如下：

This is to certify that annexed is a true copy from the records of this
office of the application as originally filed which is identified hereunder：

申請日：西元 2003 年 04 月 23 日
Application Date

申請案號：092109420
Application No.

申請人：(邵港科技股份有限公司、蔡懷楨)
Applicant(s)

局長
Director General

蔡練生

發文日期：西元 2003 年 11 月 5 日
Issue Date

發文字號：09221113160
Serial No.

發明專利說明書

(填寫本書件時請先行詳閱申請書後之申請須知，作※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：092109420 ※IPC分類：

※ 申請日期：2003.04.23

壹、發明名稱

(中文) 表現二螢光基因之重組質體

(英文) RECOMBINANT PLASMIDS EXPRESSING TWO FLUORESCENT GENES

貳、發明人 (共 1 人)

發明人 1 (如發明人超過一人，請填說明書發明人續頁)

姓名：(中文) 蔡 懷 楨

(英文) Tsai, Huai-Jen

住居所地址：(中文) 台北市潮州街3巷2-6號2樓

(英文) 2F, No.2-6, Lane 3, Cha Chow Street, Taipei

國籍：(中文) 中華民國 (英文) R.O.C.

參、申請人 (共 2 人)

申請人 1 (如申請人超過一人，請填說明書申請人續頁)

姓名或名稱：(中文) 郇港科技股份有限公司

(英文) TAIKONG CORP.

住居所或營業所地址：(中文) 110台北市忠孝東路4段553巷46弄11號

(英文) 11, Lane 553, Sec. 4, Chung Hsiao East. Road,
Taipei, Taiwan 110

國籍：(中文) 中華民國 (英文) R.O.C.

代表人：(中文) 方祖熙

(英文) Willis Fang

申請人 2

姓名或名稱：(中文) 蔡 懷 楨

(英文) Tsai, Huai-Jen

住居所或營業所地址：(中文) 台北市潮州街3巷2-6號2樓

(英文) 2F, No.2-6, Lane 3, Cha Chow Street, Taipei

國籍：(中文) 中華民國

(英文) R.O.C.

肆、中文發明摘要

本發明提供一個重組質體，包含：（a）一個普遍存在的啟動子，（b）一個螢光基因，該基因可操控連接並插入該普遍存在的啟動子之下游，（c）一個皮膚特異性或肌肉特異性之啟動子，以及（d）另一個螢光基因，該基因可操控連接並插入該皮膚特異性或肌肉特異性啟動子之下游，其中，該普遍存在的啟動子及皮膚特異性或肌肉特異性之啟動子具有反向性，且普遍存在的啟動子及皮膚特異性或肌肉特異性之啟動子分別位於該螢光基因及該另一個螢光基因之上游，以具有可供該等基因轉錄之方向性。此外，本發明亦提供一種宿主細胞，一種產生基因轉殖魚及帶有本發明質體的基因轉殖魚。

伍、英文發明摘要

The present invention provides a recombinant plasmid, comprising (a) a ubiquitous promoter, (b) one fluorescent gene, said gene being operably linked to and inserted downstream of said ubiquitous promoter, (c) a skin-specific or muscle-specific promoter, and (d) another fluorescent gene, said gene being operably linked to and inserted downstream of said skin-specific or muscle-specific promoter, wherein the ubiquitous promoter and the skin-specific or muscle-specific promoter have the adverse directional property and the ubiquitous promoter and the skin-specific or muscle-specific promoter are located upstream of said fluorescent gene and said another fluorescent gene respectively so as to have the directional property which permits transcription of said genes. Also provided a host cell, a method of producing a transgenic fish and transgenic fish harboring the plasmid of the invention.

陸、(一)、本案指定代表圖為：第 二 圖

(二)、本代表圖之元件代表符號簡單說明：

柒、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

捌、聲明事項

☐ 本案係符合專利法第二十條第一項□第一款但書或□第二款但書規定之期間，其日期為：_____

☐ 本案已向下列國家（地區）申請專利，申請日期及案號資料如下：

【格式請依：申請國家（地區）；申請日期；申請案號 順序註記】

1. _____

2. _____

3. _____

☐ 主張專利法第二十四條第一項優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；日期；案號 順序註記】

1. _____

2. _____

3. _____

4. _____

5. _____

6. _____

7. _____

8. _____

9. _____

10. _____

☐ 主張專利法第二十五條之一第一項優先權：

【格式請依：申請日；申請案號 順序註記】

1. _____

2. _____

3. _____

☐ 主張專利法第二十六條微生物：

☐ 國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

1. _____

2. _____

3. _____

☐ 國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

1. _____

2. _____

3. _____

☐ 熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

玖、發明說明

(發明說明應敘明：發明所屬之技術領域、先前技術、內容、實施方式及圖式簡單說明)

發明所屬之技術領域：

本發明係有關於一個重組質體，一種產生含有該重組質體的基因轉殖魚、宿主細胞及基因轉殖動物的方法。

先前技術：

基因轉殖魚研究係利用基因由異源及同源的調節元件所驅動，並由組成或組織特異性表現基因所產生的。調控元件包括抗凍蛋白、鼠金屬硫蛋白、雞的 δ -結晶、鯉魚 β 肌動蛋白、鮭魚組織蛋白 H3 及鯉魚 α 球蛋白的基因等等。然而，於基因轉殖魚中使用這些 DNA 元件有很大的缺點，包括表現效率低及轉殖基因的鑲嵌型表現。

將青鱗魚 (mekada) β 肌動蛋白啟動子所驅動的 lac 報導基因顯微注射入青鱗魚卵後，雖然表現很少且具有高度的鑲嵌性，但還是會導致 lacZ 基因短暫的表現，甚至在第一子代也會表現出來。Hamada 等人將綠色螢光蛋白與青鱗魚 β 肌動蛋白啟動子融合後，顯微注射至魚卵所產生出來的青鱗魚胚胎的報告中也有類似的結果。(Hamada *et al.*, 1998, Mol Marine Biol Biotechnol 7: 173-180)。

Chi-Yuan Chou 等人發表了一個兩端連接倒轉末端重複序列，以增加青鱈魚體內轉殖基因表現效率的 DNA 構築質體。轉殖基因在第 0 代及之後兩代的表現都呈一致性 (Chi-Yuan Chou *et al.*, 2001, Transgenic Research 10: 303-315)。此外，Chung-Der Hsiao 等人也指出將腺相關病毒倒轉末端重複序列 (AAV-ITRs) 嵌入轉殖基因後，會使得斑馬魚第 0 代的基因表現一致，並使轉殖基因的轉移很穩定 (Chung-Der Hsiao *et al.*, 2001, Developmental Dynamics 220:323-336)。

斑馬魚 (zebrafish; *Danio rerio*) 為脊椎動物發育生物學研究的一種新的模式生物。以斑馬魚為實驗模式有幾個主要的優點，例如卵與胚胎的取得容易、胚胎形成過程的組織清晰、體外發育、世代時間短、及成魚和幼魚皆易於飼養等。

已有人利用包括大鼠肌凝蛋白輕鏈增強子 (Moss, J. B. *et al.*, Green fluorescent protein marks skeletal muscle in murine cell lines and zebrafish. Gene 173,8998, 1996)、斑馬魚及吳郭魚之第一型類胰島素生長因子啟動子 (Chen, J. Y. *et al.*, Isolation and characterization of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) insulin-like growth factors gene and

proximal promoter region (DNA Cell Biol. 17, 359-376, 1998) 等各種不同的基因啟動子，將已知的螢光基因如 GFP 基因（其中包括 EGFP 基因）導入斑馬魚中。這些基因轉殖實驗的目的都是為了開發出一個可用於分析基因表現的 GFP 基因轉殖系統或測試基因啟動子中的調控 DNA 元件。

專利號 W00049150 揭示一種由單一螢光基因（如 GFP）所表現的螢光基因轉殖觀賞魚。不過，仍然未開發出任何一種可一致及穩定地表現出二種或二種以上之螢光基因的魚類。

發明內容：

發明摘述：

本發明係有關於一個重組質體，包含：（a）一個普遍存在的啟動子，（b）一個螢光基因，該基因可操控連接並插入該普遍存在的啟動子之下游，（c）一個皮膚特異性或肌肉特異性之啟動子，以及（d）另一個螢光基因，該基因可操控連接並插入該皮膚特異性或肌肉特異性啟動子之下游，其中，該普遍存在的啟動子及皮膚特異性或肌肉特異性之啟動子具有反向性，且普遍存在的啟動子及皮膚特異性或肌肉特異性之啟動子分別位於該螢光基因

及該另一個螢光基因之上游，以具有可供該等基因轉錄之方向性。

本發明亦有關於一種含有本發明質體之宿主細胞。

另外，本發明還關於一個產生基因轉殖魚之方法，該方法包括：

- a) 將本發明之質體導入魚卵細胞或胚胎細胞中，及
- b) 使卵細胞或胚胎細胞發育成魚，其中本發明之質體導入此魚之基因組中。

本發明進一步關於一個可產生同時表現二種螢光基因的基因轉殖魚之方法，該方法包含下列步驟：

- a) 於適當的限制酶切割位置，以限制酶切割本發明之質體，以獲得兩個質體片段 I 及 II，其中該質體 I 含有本發明之質體中所定義的 a) 及 b) 片段，而該質體 II 含有本發明之質體中所定義的 c) 及 d) 片段；
- b) 分別將該步驟 a) 之質體 A 及 B 導入魚卵細胞或胚胎細胞內；及
- c) 使該魚同時表現出質體 I 及 II。

本發明亦關於一種經由所發明的質體轉化過的基因轉殖動物。

發明詳述：

本發明提供了一種可將二種或二種以上（例如綠色及紅色螢光）的基因導入魚體內之重組質體。這些魚在一般的光源下，會呈現出均勻一致且強烈的螢光。

本發明提供一個重組質體，包含：（a）一個普遍存在的啟動子，（b）一個螢光基因，該基因可操控連接並插入該普遍存在的啟動子之下游，（c）一個皮膚特異性或肌肉特異性之啟動子，以及（d）另一個螢光基因，該基因可操控連接並插入該皮膚特異性或肌肉特異性啟動子之下游，其中該普遍存在的啟動子及皮膚特異性或肌肉特異性之啟動子具有反向性，且普遍存在的啟動子及皮膚特異性或肌肉特異性之啟動子分別位於該螢光基因及該另一個螢光基因之上游，以具有可供該等基因轉錄之方向性。

文中提到術語「上游」及「下游」，意即當參考方向定義為從螢光基因的起始密碼子至終止密碼子的方向時，某一點位於和參考方向同一方向的一端，便稱之為該點的「下游」，而和參考方向相反的一端則為該點的「上游」。

根據本發明，其普遍存在的啟動子係用於驅動本發明之質體表現出螢光基因。普遍存在的啟動子及皮膚特異性或肌肉特異性之啟動子具有反向性，且普遍存在的啟動子

位於該螢光基因之上游，以具有可供螢光基因轉錄之方向性。普遍存在的啟動子最好選自 β -肌動蛋白、elongation-1- α 、18S-Rdna 或 5S-rDNA 所組成的群組。

根據本發明，皮膚特異性或肌肉特異性之啟動子係用來驅動螢光基因之表現。皮膚特異性或肌肉特異性之啟動子位於該螢光基因之上游，以具有可供螢光基因轉錄之方向性。具皮膚特異性或肌肉特異性之啟動子最好選自 α -肌動蛋白、肌鈣蛋白(troponin)T、肌鈣蛋白 C、肌凝蛋白之重鏈、細胞角質蛋白 II C 型 (cytokeratin type II C) 或 S-100 所組成的群組。

根據本發明，任何一種螢光基因都可被插入本發明質體之啟動子的上游。螢光基因最好選自綠色、紅色、黃色或藍色螢光基因所組成的群組。這些螢光基因可在市面上買得到，例如，可購自 Clonteh Laboratories Inc.、Lighttools Research 及 BD Biosciences Pharmingen 等。以選自綠色或紅色螢光基因組為較佳。

Hiroshi Otsuki 等人指出，當使用普遍存在的啟動子時，稻作物包括癒合組織 (calli) 在內的所有部分都會出現綠色螢光 (Hiroshi Otsuki, January 12-16, 2002, Plant, Animal & Microbe Genomes X Conference)。根據本發明，綠色螢光基因可操控連接並插入本發明之普遍

存在的啟動子之下游。綠色螢光蛋白(GFP)最初係分離自某種水母(Aequorea victoria)，且可在市面上買得到。GFP和其他生物發光報導分子不同，它只要接觸到紫外光或藍光，便可散發出明亮綠光。所散發的綠光是由於水母發光蛋白(aequorin)的能量轉移至GFP所致。GFP為一個238個胺基酸所構成、分子量為28kDa的蛋白質，其光譜主要吸收高峰為395 nm、次要高峰為470 nm、以及509 nm之單一發射峰。GFP的優點在於它的螢光不具物種依賴性，且不需靠受質、輔因子或其他蛋白質即可發出綠光。已有人成功地利用數種如大腸桿菌、酵母菌、哺乳動物細胞、昆蟲細胞及植物細胞等宿主生物及細胞來表現出GFP。

根據本發明，紅色螢光基因可購自 BD Bioscience Clontech。在實施本發明時，pDsRed2-1係用來作為紅色螢光基因的來源。pDsRed2-1可編碼出DsRed2，它是一種經過設計的DsRed變種，可較快成熟且較少非特異性聚集。DsRed2源自於香菇珊瑚的紅色螢光蛋白(drFP583; Matz, M. V., et al. (1999) *Nature Biotech.* 17:969 - 973.)，它含有一連串的沉默鹼基對變化，和人類的密碼子使用偏好於哺乳細胞中高度表現相符合(Haas, J., et al. (1996) *Curr. Biol.* 6:315 - 324.)。

在哺乳動物細胞培養中，當 DsRed2 組成性表達時，在轉染的 24 小時內便可以螢光顯微鏡偵測到散發出紅色的細胞。在表現 DsRed1 的細菌及哺乳細胞系統中經常會觀察到大的不可溶之蛋白質聚集，在表現 DsRed2 的細胞中會戲劇性地減少許多。較快成熟、且較易溶解的紅色螢光蛋白也會使得宿主細胞較具耐受性。以 DsRed2 轉染的哺乳動物細胞培養物無明顯的存活率減少之徵兆，而在那些測試的細胞株中，表現 DsRed2 的細胞所出現的形態（如附著力、光線折射）及生長特徵和未轉染過的對照組一樣。pDsRed2-1 是一個不含啟動子的 DsRed2 載體，可用於監控插入多重選殖部位 (MCS) 中的不同啟動子及啟動子/加強子組合之轉錄作用。將位於 DsRed2 上游的序列改變為 Kozak 共有的轉譯起始部位 (Kozak, M. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15:8125 - 8148.)，以增加真核細胞中的轉譯效率。在 DsRed2 基因下游的 SV40 多腺苷酸信號可引導 DsRed2 mRNA 的 3' 端作適當的處理。載體主要含有一個可供表現 SV40 T 抗原的哺乳動物細胞進行複製的 SV40 起點、一個在大腸桿菌中用於繁殖的 Puc 複製起點、以及一個製造單股 DNA 的 f1 起點。一種具有 neomycin 抗藥性的卡英 (Neo^r) 可利用 G418 來選出穩定轉染的哺乳動物細胞，這個卡匣含有 SV40 早期啟動子、Tn5 之

neomycin/kanamycin 抗藥性基因、以及來自皰疹病毒胸腺嘧啶激酶 (HSV TK) 基因的多腺苷酸信號。在大腸桿菌中，卡匣上游的細菌啟動子可表現出 kanamycin 抗藥性。

根據本發明，重組質體係以此技藝中已知之標準分子技術，將含有普遍存在的啟動子及一個螢光基因之質體，以及含有皮膚特異性或肌肉特異性的啟動子及另一個螢光基因之質體結合起來所構成的。在實施本發明時，以限制酶切割含有普遍存在的啟動子及綠色螢光基因的質體，以得到一個 4.7 kb 的片段。含有皮膚特異性或肌肉特異性的啟動子及紅色螢光基因的質體也以限制酶切割而得到一段 7.5 kb 的片段。經由接合步驟將所產生的 4.7 kb 片段及 7.5 kb 片段連接在一起。

本發明提供了一種含有本發明質體的宿主細胞。根據本發明，可利用一些宿主系統來容納本發明之質體，這些宿主系統包括以重組噬菌體轉形的細菌、質體或黏質體 DNA 表現載體等微生物，以酵母菌表現載體轉形的酵母菌，以病毒表現載體感染過的昆蟲細胞系統，以病毒表現載體或細菌表現載體感染過的植物細胞系統，或動物細胞系統等，但不僅限於此。

本發明提供一種以本發明質體轉形過的基因轉殖動物。根據本發明，此基因轉殖動物可以是任何方便取得的

動物，例如非人類之哺乳動物，如用於實驗室測試過程中的啮齒類動物及魚類就是一例。使用例如經由顯微注射或注射重組載體之傳統又方便的基因操作技術，將本發明質體導入動物體內，便可方便地得到本發明之基因轉殖動物。基因可經由導入細胞的前驅物而直接或間接進入動物的一個細胞或所有細胞中。基因操作技術包括古典的雜交育種、體外授精、導入可能會併入染色體中或成為染色體外複製的 DNA 之重組 DNA 分子。基因轉殖動物以基因轉殖魚為佳，而以自青鱗魚、斑馬魚、七彩神仙魚、金魚、鰭魚、慈鯛、孔雀魚、龍魚、錦鯉、鬥魚或其他觀賞魚中所選出的基因轉殖魚為較佳者。根據本發明，所發明之基因轉殖魚可表現出一種摻雜綠色及紅色的顏色。

根據本發明的一個具體實施例，本發明的質體可用於產生出表現一種螢光、摻雜螢光及同時表現不同螢光的魚。就表現一種螢光基因來說，利用適當的限制酶切割所發明的質體，以產生出含有一種螢光基因的質體片段。將所產生出來的一段質體導入魚的卵細胞或胚胎細胞內，以得到表現一種螢光基因的魚。就表現摻雜螢光來說，將所發明的質體導入魚卵或胚胎細胞內，以得到表現摻雜螢光的魚。就同時表現不同的螢光來說，將含有不同螢光基因

的不同質體導入魚卵或胚胎細胞內，以得到同時表現不同螢光基因的魚。

較佳地，本發明質體可用來產生出表現單一綠色螢光基因、單一紅色螢光基因、摻雜綠色及紅色螢光基因或同時表現綠色及紅色螢光基因的魚。就表現綠色螢光的魚來說，以限制酶於適當的位置切割本發明之質體，以得到一個含有普遍存在的啟動子及操控連接並插入該普遍存在啟動子的下游之綠色螢光基因的質體。將所產生的質體導入魚卵或胚胎內，便可表現出綠色螢光。就表現紅色螢光的魚來說，以限制酶於適當的位置切割本發明之質體，以得到一個含有皮膚特異性或肌肉特異性的啟動子及操控連接並插入該皮膚特異性或肌肉特異性的啟動子下游之紅色螢光基因的質體，並將所產生的質體導入魚卵細胞或胚胎細胞內，便可表現出紅色螢光。

根據本發明的一個較佳具體實施例，本發明提供了一個可產生出表現摻雜螢光的基因轉殖魚之方法，該方法包含 a) 將發明之質體導入魚卵細胞或胚胎細胞中，及 b) 讓卵細胞或胚胎細胞發育成魚，其中將所發明之質體導入魚的基因組中，以得到可表現出摻雜螢光的魚。螢光基因以選自綠色、紅色、黃色或藍色螢光基因所組成的群組為

佳，如螢光基因選自綠色或紅色螢光基因所組成的群組則更佳。

根據本發明的一個較佳具體實施例，本發明提供了一個可產生出同時表現兩種不同螢光的基因轉殖魚之方法，該方法包含下列步驟：

a)以限制酶於適當的限制酶切割位置切割申請專利範圍第一項之質體後，可得到 I 及 II 兩個質體片段，其中質體 I 含有申請專利範圍第一項所定義之片段 a)及 b)，質體 II 含有申請專利範圍第一項所定義之片段 c)及 d)；

b)將步驟 a)所述的各個質體 A 及質體 B 分別導入魚卵細胞或胚胎細胞中，

c)使前述的魚同時表現出質體 I 及 II。

根據本發明，從發明的方法所製造出來的魚，可同時表現出兩種不同的螢光。以限制酶於適當的位置切割本發明之質體，以得到兩個質體，其中一個質體含有普遍存在的啟動子及一個操控連接並插入該普遍存在啟動子的下游的螢光基因，另一個質體則含有皮膚特異性或肌肉特異性的啟動子及另一個操控連接並插入該皮膚特異性或肌肉特異性啟動子下游的螢光基因。然後，將所產生的兩個質體分別導入魚中，以各自表現出不同的螢光基因。螢光

基因選自綠色、紅色、黃色或藍色螢光基因所組成的群組為佳，如螢光基因選自於含有綠色及紅色螢光基因的所組成的群組則更佳。

根據本發明的一個較佳具體實施例，從本發明方法所得到的魚可同時顯示出紅色及綠色螢光。較佳地，從本發明方法所得到的魚可利用此技藝已知的技術來進一步育種繁殖，以得到一致及穩定表現紅色和綠色螢光的魚類。

下列實例進一步說明本發明，但非欲限制本發明之範圍。

實施方式：

實例

實例 1 建構包含 GFP 序列的質體

分離具皮膚特異性或肌肉特異性和能普遍存在地表現斑馬魚 cDNA 之無性繁殖株。cDNA 無性繁殖系之分離與定序如 Gong, Z. et al. 在 Gene 201, 87-98 (1997) 中所述。基本上，隨機 cDNA 無性繁殖株是選自斑馬魚胚胎和成魚之 cDNA 基因庫，且經由單一定序反應來部份定序每一 cDNA 無性繁殖株。這段部分序列隨後用來確認已定序無性繁殖株之潛在功能和組織特異性。

如圖二所示，質體 A 為一構築質體之結構觀。GFP 由普遍存在之啟動子所驅動。當質體被 *NotI* 及 *PstI* 限制酶線性化後，以去氧核苷酸 (dNTP) 將其黏性末端填平，再自洋菜膠電泳中回收 4.7kb 之片段。此質體依本發明說明構築質體之組成。

實例 2 建構一段包含紅色螢光蛋白序列的質體

如實例 1，質體 B 為如圖二所示構築質體之結構觀。DsRed 由皮膚特異性或肌肉特異性之啟動子所驅動。當質體被 *PstI* 限制酶線性化後，以去氧核苷酸 (dNTP) 將其黏性末端填平，再自洋菜膠電泳中回收 7.5kb 的片段。此質體依本發明說明構築質體之組成。

實例 3 藉由接合質體 A 和 B 來構築質體

如圖二所示，質體 C 為一構築質體之結構觀，表示為經由限制酶 *NotI* 所切割之線性化片段，或是經由限制酶 *NotI* 或 *SalI* 所切割之線性化片段。此質體依本發明說明用於基因轉移的構築質體之組成。

實例 4 引入質體及螢光鏡檢

在人工條件十四小時光照與十小時黑暗下及以 Tetramin (Tetra Germany) 飼育斑馬魚。受精三十分鐘內收集卵且去除連結細絲。將受精卵保持在 6°C 直到用

DNA 片段顯微注射為止，該 DNA 片段（如以 NotI 切割之線性化質體 C 或以 NotI 及 SalI 切割之線性化質體 C）於第一次分裂前，以 $10 \mu\text{g/ml}$ 濃度注入細胞質。在 26°C 於蒸餾水中培育經注射卵。

在明亮域下用解剖立體顯微鏡（MZAP0, Leica, Germany）觀察胚胎。偵測綠及/或紅色螢光之暗域發光係以配備 GFP 及/或紅色螢光蛋白之立體顯微鏡執行。用帶有 ISO 400 底片與底片定時曝光之控制器之相機拍照。

實例 5：螢光基因轉殖魚可能之應用

螢光基因轉殖魚在市場上可用來作為觀賞魚。可進行 GFP 基因轉殖動物與野生魚類或另一種基因轉殖魚的配種來開發出穩定的基因轉植株。經由分離出更多的斑馬魚基因啟動子，例如具有眼睛特異性、骨特異性、尾巴特異性等，以及/或經由傳統的方法飼養這些基因轉殖斑馬魚，便可製造出更多種類的螢光基因轉殖斑馬魚。

因為藍色螢光蛋白（BFP）基因、黃色螢光蛋白（YFP）基因及青綠色螢光蛋白（CFP）基因都可於 Clontech 買得到，因此利用相同的技術便可產生出多種顏色的螢光魚。例如，在具有眼睛特異性的啟動子之下帶有 GFP、在

具有皮膚特異性的啟動子之下帶有 BFP、以及在具有肌肉特異性的啟動子之下帶有 YFP 的基因轉殖魚，將出現下列多種的螢光色：綠眼、藍皮膚及黃眼睛。將具有不同組織特異性的啟動子及螢光蛋白基因重新組合後，將可創造出更多不同顏色變化的基因轉殖魚。利用相同組織來表達二種或二種以上不同的螢光蛋白，便可創造出一種中間色。

藉由使用重金屬（例如鎘、鈷、鉻）或荷爾蒙（例如雌激素、雄性素或其他類固醇荷爾蒙）可誘導的啟動子，可開發出一種用來監控環境污染及評估人類飲用及水耕用的水質之生物感測系統。在這樣的一個生物感測系統中，當如重金屬及雌激素（或其衍生物）之類的污染物在水中環境達到閾值濃度時，基因轉殖魚便會發出綠色的螢光（或其他顏色，視所使用之螢光蛋白基因而定）。此一生物感測系統優於傳統的分析方法，因其速度快、可看得見、以及可直接鑑別出水中環境所發現到的複雜混合物中的特定化合物，且便於攜帶或較不需要附屬的儀器。除此之外，生物感測系統也可提供有關生物毒性之直接資訊，且其為生物所能分解及可再生的。

數種物質的環境監控，亦可藉由創造出一種具有可編碼出由對各種物質有反應的啟動子所驅動之不同顏色的

螢光蛋白的基因之基因轉殖魚，然後便可觀察到魚在環境中所顯示出的特定顏色。或者，也可以特有的載體來轉形一些魚，然後可將這些魚併入用來監測環境的魚群中，並觀察每一隻魚所表現出來的顏色。

此外，螢光基因轉殖魚在科學研究材料的市場中應該也具有價值，因為它們可用於如追蹤細胞品系及細胞遷移之胚胎方面的研究。表現 GFP 之基因轉殖魚的細胞也可用來作為細胞移植及細胞核移植實驗中的細胞及遺傳標記。

本發明已成功地證明可在斑馬魚上建構兩個螢光基因，這也能用於其他種類的魚，例如青鱈魚、金魚、包括錦鯉在內的鯉魚、鰕魚、吳郭魚、吻仔魚、鯰魚、天使魚、七彩神仙魚、鰻魚、鬥魚、蝦虎魚、馬甲魚、孔雀魚、劍尾魚（紅劍）、hatchet 魚、摩利魚、淡水鯊魚等。

圖式簡單說明：

圖一顯示表現二種螢光基因之基因轉殖魚相片。

圖二顯示質體 A 和質體 B 連接後產生質體 C 之流程圖。

唯以上所述者，僅係本發明部份較佳實例說明，故凡應用本發明說明及申請專利範圍所為之等效方法之變化，理應包含在本發明之專利範圍內。

拾、申請專利範圍

申請專利範圍：

1. 一個重組質體，包含：(a) 一個普遍存在的啟動子，
(b) 一個螢光基因，該基因可操控連接並插入該普遍存在的啟動子之下游，(c) 一個皮膚特異性或肌肉特異性之啟動子，以及(d) 另一個螢光基因，該基因可操控連接並插入該皮膚特異性或肌肉特異性啟動子之下游，其中該普遍存在的啟動子及皮膚特異性或肌肉特異性之啟動子具有反向性，且普遍存在的啟動子及皮膚特異性或肌肉特異性之啟動子分別位於該螢光基因及該另一個螢光基因之上游，以具有可供該等基因轉錄之方向性。
2. 如申請專利範圍第 1 項之重組質體，其中該普遍存在的啟動子可選自 β -肌動蛋白、elongation-1- α 、18S-Rdna 或 5S-rDNA 所組成的群組。
3. 如申請專利範圍第 1 項之重組質體，其中該皮膚特異性或肌肉特異性之啟動子可選自 α -肌動蛋白、肌鈣蛋白(troponin)T、肌鈣蛋白 C、肌凝蛋白之重

鏈、細胞角質蛋白 IIC 型 (cytokeratin type IIC)
或 S-100 所組成的群組。

4. 一種宿主細胞，包含申請專利範圍第 1 項之質體。

5. 一種產生基因轉殖魚的方法，該方法包含：

a) 將申請專利範圍第 1 項之質體導入魚卵細胞或胚胎
細胞中，以及

b) 使卵細胞或胚胎細胞發育成魚，其中申請專利範圍
第 1 項之質體導入此魚之基因組中。

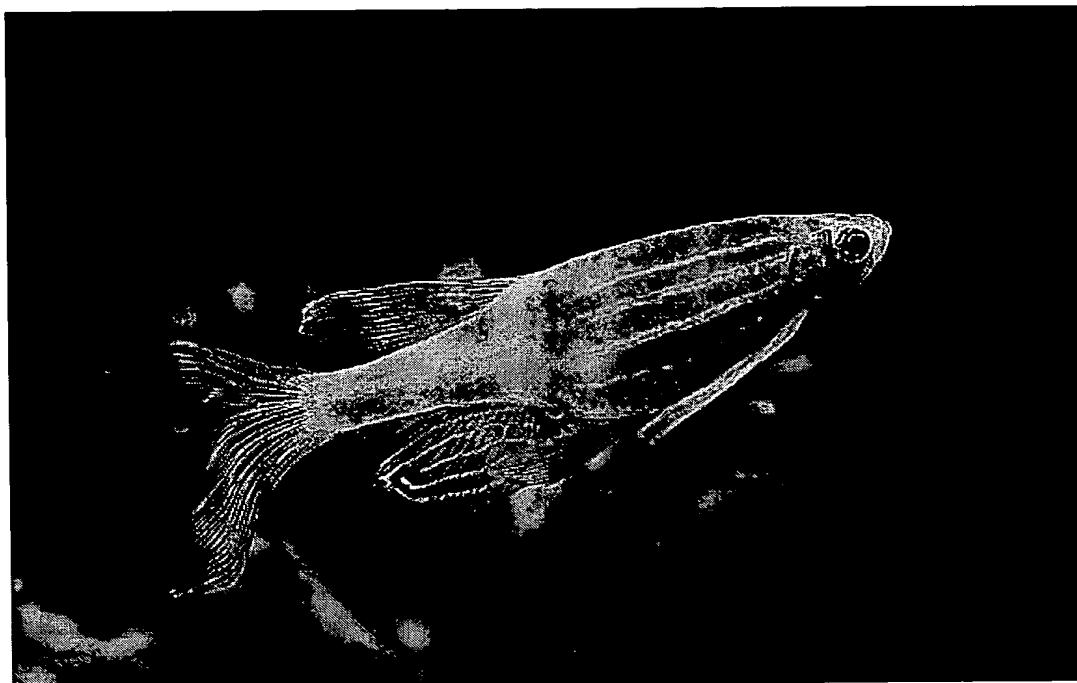
6. 如申請專利範圍第 5 項之基因轉殖魚，其中該該魚可
選自青鱈魚、斑馬魚、七彩神仙魚、金魚、鱒魚、慈鯛、
孔雀魚、龍魚、鯉魚或鬥魚所組成的群組。

7. 一種基因轉殖魚，包含 (a) 一個普遍存在的啟動子，
(b) 一個螢光基因，該基因可操控連接並插入該普遍
存在的啟動子之下游，(c) 一個皮膚特異性或肌肉特
異性之啟動子，以及 (d) 另一個螢光基因，該基因可
操控連接並插入該皮膚特異性或肌肉特異性啟動子之
下游，其中該普遍存在的啟動子及皮膚特異性或肌肉特
異性之啟動子具有反向性，且普遍存在的啟動子及皮膚
特異性或肌肉特異性之啟動子分別位於該螢光基因及
該另一個螢光基因之上游，以具有可供該等基因轉錄之
方向性。

8. 如申請專利範圍第 7 項之基因轉殖魚，其中該螢光基因選自綠色、紅色、黃色或藍色螢光基因所組成的群組。
9. 如申請專利範圍第 8 項之基因轉殖魚，其中該螢光基因選自綠色和紅色螢光基因所組成的群組。
10. 一種製造同時表現兩種不同螢光基因之基因轉殖魚的方法，該方法包含下列步驟：
 - a) 於適當之限制酶切割位置，以限制酶切割申請專利範圍第一項之質體，以獲得兩個質體片段 I 及 II，其中該質體 I 含有申請專利範圍第 1 項所定義的 a) 及 b) 片段，而質體 II 則含有申請專利範圍第 1 項所定義的 c) 及 d) 片段；
 - b) 分別將該步驟 a) 之質體 I 及 II 導入魚卵細胞或胚胎細胞內，及
 - c) 使該的魚同時表現出質體 I 及 II。
11. 如申請專利範圍第 10 項之方法，其中該螢光基因可選自綠色、紅色、黃色或藍色螢光基因所組成的群組。
12. 如申請專利範圍第 11 項之方法，其中該螢光基因可選自綠色或紅色螢光基因所組成的群組。

拾壹、圖式

圖一



BEST AVAILABLE COPY

圖二

